

## イマチユリン抗体を用いた未熟期初期におけるイマチユリンの細胞内局在の検討

佐々木 裕愛, 芳賀 信幸 (石巻専修大学・院・理工)

### Intracellular localization of immaturin in the early phase of immaturity detected by anti-immaturin antibody in both wild-type and early mature mutants of *Paramecium*

Yui SASAKI and Nobuyuki HAGA

(Department of Biological Engineering, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University)

#### SUMMARY

The sexual activity of *Paramecium* is expressed at about 50 fissions after conjugation in wild-type cells, when the cells are once more able to conjugate. However, in the case of early mature mutants, sexual activity is expressed at about 30 fissions after conjugation. This study was undertaken to analyze the molecular mechanisms regulating the length of the immaturity period by comparing the different characters in these two strains. We have produced an antibody against immaturin. Using this antibody, we observed the cells in the early stage of their immaturity period using the indirect immunofluorescence method. Results show that string-like objects showing strong fluorescent signals were observed in the macronucleus of the early mature mutant, although this was not observed in wild type cells. On the other hand, no difference was found in the intensity of fluorescent signal in the cytoplasm of the early mature mutant and that of the wild type cells.

**[目的]** ゾウリムシの生活史には、未熟期、成熟期、老衰期がある。ゾウリムシは相補的な接合型の細胞と出会うと、性的認識（交配反応）により有性生殖である接合を行う。また、接合過程を終えると細胞分裂を繰り返すが、ある一定の分裂回数に至るまでは次の接合を行うことはできない。この期間を未熟期と呼ぶ。

ゾウリムシは通常、野生型であれば接合後約 50 回の分裂回数で性的能力が現れ、接合が可能になる。しかし、約 30 回という少ない分裂回数で性的能力が現れる早熟突然変異体が存在する (Myohara and Hiwataishi, 1978)。

本研究では、野生型と早熟突然変異体の未熟期の長さの違いに着目して、未熟期の長さを制御している仕組みを明らかにすることを目的とした。現在、イマチユリンに対する抗体が調製されている (Haga, 未発表)。そこで、この抗体を用いた間接蛍光抗体法で、野生型と早熟突然変異体の未熟期初期の細胞におけるイマチユリンの発現量と細胞内局在性の比較を行った。観察には、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた。

#### [材料と方法]

##### ゾウリムシの株

金沢で採集された野外株 KNZ シリーズ (*Paramecium caudatum*, syngen 3, mating type E と O : 金沢大・遠藤) で、接合によるかけ合わせに

よって樹立した未熟期と成熟期のクローンを用いた。また、早熟突然変異体 (Myohara and Hiwataishi, 1978) の子孫株 (宮教大・見上) から更に生存率の高い子孫株である REM シリーズ (石巻専修大・佐々木) 用いて未熟期と成熟期のクローンを作り、野生型と比較した。

##### 培養と交配反応実験

培養はレタスジュース法で行った (Hiwataishi, 1968)。接合能力の発現は 2 ml の培養液に約 1000 細胞を接種後、翌日から毎日 4, 8, 8 ml と培養液を加えて培養した試験管培養で、定常期一日目の細胞を、交配反応活性が発現しているテスターと混合した後、交配反応の有無で判定した。

##### 間接蛍光抗体法

イマチユリンの発現と細胞内の分布状況を比較するため、1 次抗体を使用したものと、使用しなかったもの (コントロール) の 2 つの実験群で行った。

細胞を 2.5% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、乾燥し、0.1% Triton X-100、0.1 M glycine、0.5% LMF の順で処理した。その後、PBS で 500 倍希釈した 1 次抗体 (NH3545) および PBS で 200 倍希釈した 2 次抗体 (Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG (F (ab') fragment) を用いて処理し、蛍光顕微鏡 (Zeiss) と共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Nikon A1) で観察した。

**[結果]** 間接蛍光抗体法による観察の結果、1 次抗体

を使用した細胞質内では、野生型と早熟突然変異体の未熟期初期における蛍光シグナルの発現量および細胞内分布状況には大きな違いは見られなかった。しかし、早熟突然変異体の未熟期初期の大核内に、強い蛍光シグナルを表す紐状の物体が確認された。一方、このような紐状の物体は野生型の未熟期初期の細胞では確認されなかった。野生型と早熟突然変異体の成熟期の細胞内にも確認されなかった。そこで、紐状の物体を Green Body と名付けることとした。共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した結果、Green Body は DAPI で染色される物質を含まないことが明らかになった。

一方、1次抗体を使用しなかったコントロールでは、どの細胞においても蛍光シグナルは全く確認されなかった。

**[考察]** 野生型と早熟突然変異体の未熟期初期の細胞における、蛍光シグナル量に大きな差は見られなかったことから、分裂回数が少ない段階では、イマ

チュリンの発現量はこれら2つの株間ではほぼ同程度であると考えられる。また、早熟突然変異体の未熟期初期の大核内に紐状の物体 (Green Body) が確認されたことから、少ない分裂回数の細胞では、大核内にもイマチュリンが存在する可能性が示唆された。DAPI による染色像との比較から、Green Body は染色体の一部になっているわけではなく、大核内に独立に存在しているものと思われる。

細胞質の移植実験から、イマチュリンは未熟期の細胞質に存在するタンパク質であると考えられてきた。しかし、本実験によって、早熟突然変異体の未熟細胞の大核内にも存在することが明らかになった。これは野生型と早熟突然変異体の未熟期の長さを制御する仕組みを明らかにする上で、何か重要な手がかりとなるかもしれない。

#### **[文献]**

- 1) Myohara and Hiwatashi (1978) *Genetics*, 90, 227-242.
- 2) Hiwatashi (1968) *Genetics*, 58, 373-386.